

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-242622

(P2004-242622A)

(43) 公開日 平成16年9月2日 (2004. 9. 2)

(51) Int. Cl. ⁷

C 1 2 N 15/00

F I

C 1 2 N 15/00

Z

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2003-38145 (P2003-38145)
(22) 出願日 平成15年2月17日 (2003. 2. 17)

(71) 出願人 000005201
富士写真フイルム株式会社
神奈川県南足柄市中沼 2 1 〇番地
(74) 代理人 100105647
弁理士 小栗 昌平
(74) 代理人 100105474
弁理士 本多 弘徳
(74) 代理人 100108589
弁理士 市川 利光
(74) 代理人 100115107
弁理士 高松 猛
(74) 代理人 100090343
弁理士 濱田 百合子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸の分離精製用洗浄液

(57) 【要約】

【課題】表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を含む核酸の分離精製方法において使用するための、固相に吸着された核酸を脱着させることなく固相に非特異的に吸着された不純物だけを洗い流すことができる洗浄液を提供すること。

【解決手段】表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を含む核酸の分離精製方法において使用するための、水溶性アルコール水溶液から成る洗浄液。

【選択図】 なし

(2)

【特許請求の範囲】

【請求項1】

表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を含む核酸の分離精製方法において使用するための、水溶性アルコール水溶液から成る洗浄液。

【請求項2】

カオトロピック性物質を含まない、請求項1に記載の洗浄液。

【請求項3】

水溶性アルコールと水のみから成り、各種塩および界面活性剤を含まない、請求項1又は2に記載の洗浄液。

【請求項4】

水溶性アルコール濃度が20重量%以上100重量%以下である、請求項1から3の何れかに記載の洗浄液。

【請求項5】

水溶性アルコールがエタノールである、請求項1から4の何れかに記載の洗浄液。

【請求項6】

表面に水酸基を有する有機高分子がアセチルセルロースの表面鹸化物である、請求項1から5の何れかに記載の洗浄液。

【請求項7】

表面に水酸基を有する有機高分子がトリアセチルセルロースの表面鹸化物である、請求項1から6の何れかに記載の洗浄液。

【請求項8】

アセチルセルロースが多孔膜である、請求項1から7の何れかに記載の洗浄液。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸を分離精製において使用するための洗浄液に関する。より詳細には本発明は、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を含む核酸の分離精製方法において使用するための洗浄液に関する。

【0002】

【従来の技術】

核酸は、様々な分野で種々の形態で使用されている。例えば、組換え核酸技術の領域においては、核酸をプローブ、ゲノム核酸、およびプラスミド核酸の形状で用いることを要求する。

【0003】

診断分野においても、核酸は種々の方法で用いられている。例えば、核酸プローブは、ヒトの病原体の検出および診断に日常的に用いられている。同様に核酸は遺伝障害の検出に用いられている。核酸はまた食品汚染物質の検出にも用いられている。さらに、核酸は遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現におよぶ種々の理由により、興味ある核酸の位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

【0004】

多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を消費する煩雑な操作は核酸の損失に結びつきやすい。血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料の核酸の精製においては、コンタミネーションおよび疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

【0005】

広く知られた精製方法の一つに、核酸を二酸化珪素、シリカポリマー、珪酸マグネシウム等の表面に吸着させ、引き続き洗浄、脱着等の操作によって精製する方法がある（例えば、特公平7-51065号公報）。この方法は、分離性能としては優れているが、同一性能の吸着媒体の工業的大量生産が困難であり、かつ取扱いが不便で、種々の形状に加工しがたい等の問題点がある。また、固相に吸着された核酸を脱着させることなく固相に非特

(3)

異的に吸着された不純物だけを洗い流すため、洗浄液中にカオトロピック物質を添加する必要があった。しかしながら、洗浄液は最終工程の核酸を脱着させる工程にコンタミする可能性が高く、洗浄液中のカオトロピック物質が抽出された核酸サンプルにコンタミするとその後の分析、反応（たとえばPCR反応）に致命的な阻害を引き起こす。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を含む核酸の分離精製方法において使用するための洗浄液であって、固相に吸着された核酸を脱着させることなく固相に非特異的に吸着された不純物だけを洗い流すことができる洗浄液を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる過程を含む核酸の分離精製方法において水溶性アルコール水溶液から成る洗浄液を用いて核酸の洗浄を行なうことによって、固相に吸着された核酸を脱着させることなく固相に非特異的に吸着された不純物だけを洗い流すことができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

即ち、本発明によれば、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を含む核酸の分離精製方法において使用するための、水溶性アルコール水溶液から成る洗浄液が提供される。

【0009】

好ましくは、本発明の洗浄液は、カオトロピック性物質を含まない洗浄液である。

好ましくは、水溶性アルコール濃度は20重量%以上100重量%以下である。

好ましくは、水溶性アルコールはエタノールである。

好ましくは、表面に水酸基を有する有機高分子はアセチルセルロースの表面鹸化物であり、さらに好ましくはトリアセチルセルロースの表面鹸化物である。

好ましくは、アセチルセルロースは多孔膜である。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

(1) 本発明の洗浄液

本発明の洗浄液は、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を含む核酸の分離精製方法において使用するための洗浄液であり、水溶性アルコールを含む水溶液であることを特徴とする。本発明の洗浄液はカオトロピック性物質（例えば、グアニジウム塩、ヨウ化ナトリウム、過塩素酸ナトリウムなど）を含まないことが好ましい。さらに、水溶性アルコールと水のみから成り、各種塩および界面活性剤を含まない洗浄液が特に好ましい。

【0011】

本発明において、水溶性アルコール濃度は特に好ましくは20%重量以上100%重量以下であり、さらに好ましくは30重量%以上80%重量以下であり、特に好ましくは40重量%以上80重量%以下である。

本発明で用いる水溶性アルコールは炭素数1から4のアルコールであることが好ましく、例えば、メタノール、エタノール、イソプロパノール、*n*-イソプロパノール、又はブタノールなどが挙げられる。水溶性アルコールとしては、エタノールが特に好ましい。

【0012】

本発明の洗浄液は、上記した水溶性アルコール以外に、緩衝剤及び／又は界面活性剤を含むことができる。緩衝剤としては公知の緩衝剤を使用することができ、例えば、Trisなどが挙げられる。Trisを使用する場合の好ましい濃度は10～100mMである。界面活性剤としては公知の界面活性剤を使用することができ、例えば、Triton-X

(4)

100を使用することができるが、その他、SDS、コール酸ナトリウム又はサルコシナトリウム等の陰イオン性界面活性剤、Tween 20又はメガファック等のノニオン性界面活性剤、その他各種の両性界面活性剤などを使用してもよい。Triton-Xを使用する場合の好ましい濃度は0.1～10重量%である。

【0013】

(2) 本発明の洗浄液を用いた核酸の分離精製方法

本発明の洗浄液を用いる核酸の分離精製方法は、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を行なうものである。

本発明において「核酸」は一本鎖、二本鎖のいずれでもよく、また、分子量の制限も無い。

【0014】

表面に水酸基を有する有機高分子としては、アセチルセルロースの表面鹸化物が好ましい。アセチルセルロースとしては、モノアセチルセルロース、ジアセチルセルロース、トリアセチルセルロースの何れでもよいが、特にトリアセチルセルロースが好ましい。本発明では、表面鹸化したアセチルセルロースを固相として使用することが好ましい。ここで表面鹸化とは、鹸化处理液（例えば、NaOH）が接触する表面だけが鹸化されることを言う。本発明では、固相の構造体はアセチルセルロースのままで、固相の表面だけが鹸化されていることが好ましい。これにより、表面鹸化处理の程度（表面鹸化度）で固相表面の水酸基の量（密度）をコントロールすることができる。

【0015】

表面に水酸基を有する有機高分子の表面積を大きくするためには、表面に水酸基を有する有機高分子を膜化することが好ましい。また、アセチルセルロースは多孔膜でも非孔性膜でもよいが、膜を多孔性とすることが更に好ましい。固相が多孔性膜の場合、膜の構造体はアセチルセルロースのままで、構造体の表面だけを鹸化することが好ましい。これにより、表面鹸化处理の程度（表面鹸化度）×孔径により空間的な水酸基の量（密度）をコントロールすることができる。また、膜の構造体はアセチルセルロースから構成されているため、堅固な固相を得ることができる。ここで、アセチルセルロースを表面鹸化して表面にのみ水酸基を導入するということは、構造体はアセチルセルロースのままで、表面をセルロース化するということを意味する。なお、セルロースを原材料として用いると、液体にできないため、工業的に多孔膜や平膜を製造することはできない。

【0016】

例えば、トリアセチルセルロースの膜は、商品名TACベースとして富士写真フイルムから市販されており、トリアセチルセルロースの多孔膜としては、マイクロフィルターFM500（富士写真フイルム（株）製）がある。

また、例えばポリエチレン製のビーズの表面にトリアセチルセルロースの膜を形成し、これを表面鹸化して表面に水酸基を持たせることも好ましい。この場合、トリアセチルセルロースはビーズにコーティングされることになる。ビーズの素材は、核酸を汚染等しなければよく、ポリエチレンには限定されない。

【0017】

核酸の分離効率を上げるためには、水酸基の数が多い方が好ましい。例えば、トリアセチルセルロースなどのアセチルセルロースの場合には、表面鹸化率が約5%以上であることが好ましく、10%以上であることが更に好ましい。

アセチルセルロースを表面鹸化するには、水酸化ナトリウム水溶液中に、表面鹸化したい対象を浸漬する。表面鹸化率を変えるには、水酸化ナトリウムの濃度を変えればよい。表面鹸化率は、NMRにより、残存アセチル基を定量して定められる。

【0018】

上記した核酸の分離精製方法では、好ましくは、少なくとも2個の開口を有する容器内に表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相を収容した核酸分離精製ユニットを用いて核酸の吸着及び脱着を行うことができる。

【0019】

(5)

さらに好ましくは、(a) 表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相、(b) 前記固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器、及び(c) 前記容器の一の開口に結合された圧力差発生装置を含む核酸分離精製ユニットを用いて核酸の吸着及び脱着を行うことができる。

【0020】

核酸の分離精製方法の第一の実施態様は、以下の工程を含むことができる。

- (a) 核酸分離精製ユニットの一の開口を核酸を含む試料溶液中に挿入する工程、
- (b) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を減圧状態にして核酸を含む試料溶液を吸引し、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、
- (c) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、吸引された核酸を含む試料溶液を容器外に排出する工程、
- (d) 核酸分離精製ユニットの一の開口を核酸洗浄液中に挿入する工程、
- (e) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を減圧状態にして核酸洗浄液を吸引し、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、
- (f) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、吸引された核酸洗浄液を容器外に排出する工程、
- (g) 核酸分離精製ユニットの一の開口を、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液中に挿入する工程、
- (h) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を減圧状態にして、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液を吸引し、固相に接触させる工程、及び

(i) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液を容器外に排出する工程。

【0021】

核酸の分離精製方法の第二の実施態様は、以下の工程を含むことができる。

- (a) 検体を用いて核酸を含む試料溶液を調製し、核酸分離精製ユニットの一の開口に上記の核酸を含む試料溶液を注入する工程、
- (b) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、他の開口より排出することによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、
- (c) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に核酸洗浄液を注入する工程、
- (d) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入した核酸洗浄液を上記他の開口より排出することによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、
- (e) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液を注入する工程、
- (f) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入した核酸を脱着せしめうる液を上記他の開口より排出させることによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着させ、容器外に排出する工程。

【0022】

表面に水酸基を有する有機高分子を用いた核酸の分離精製方法についてさらに具体的に説明する。本発明では、好ましくは、核酸を含む試料溶液を表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させることにより試料溶液中の核酸を固相に吸着させ、次いで、固相に吸着させた核酸を、以下に説明する好適な溶液を用いて固相から脱着させる。さらに好ましくは、核酸を含む試料溶液は、細胞又はウイルスを含む検体を細胞膜及び核膜を溶解する溶液で処理することにより核酸を液中に分散させた溶液に水溶性有機溶媒を添加し

(6)

た溶液である。

【0023】

本発明において使用できる核酸を含む試料溶液に制限はないが、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液、あるいは植物（又はその一部）、動物（またはその一部）など、あるいはそれらの溶解物およびホモジネートなどの生物材料から調製された溶液が対象となる。

【0024】

最初にこれらの検体を、細胞膜を溶解して核酸を可溶化する試薬を含む水溶液で処理する。これにより細胞膜および核膜が溶解されて、核酸が水溶液内に分散する。

細胞膜の溶解および核酸の可溶化のためには、例えば、対象となる試料が全血の場合、▲1▼赤血球の除去、▲2▼各種タンパク質の除去、及び▲3▼白血球の溶解及び核膜の溶解が必要となる。▲1▼赤血球の除去および▲2▼各種タンパク質の除去は、固相への非特異吸着および多孔膜の目詰まりを防ぐために、▲3▼白血球の溶解及び核膜の溶解は、抽出の対象である核酸を可溶化させるためにそれぞれ必要となる。特に、▲3▼白血球の溶解及び核膜の溶解は重要な工程であり、本発明の方法では、この工程で核酸を可溶化することが必要である。本明細書中以下に記載の実施例では、塩酸グアニジン、T r i t o n-X 1 0 0、プロテアーゼK（S I G M A製）を添加した状態で60℃で10分インキュベートすることによって上記の▲1▼、▲2▼及び▲3▼を同時に達成している。

【0025】

本発明で用いる核酸可溶化試薬としては、グアニジン塩、界面活性剤およびタンパク質分解酵素を含む溶液が挙げられる。

グアニジン塩としては、塩酸グアニジンが好ましいが、他のグアニジン塩（イソチオシアン酸グアニジン、チオシアン酸グアニジン）を使用することもできる。グアニジン塩の溶液中の濃度は、0.5M以上6M以下 好ましくは1M以上5M以下である。

【0026】

界面活性剤としてはT r i t o n-X 1 0 0を使用することができるが、この他にも、S D S、コール酸ナトリウム又はサルコシナトリウム等の陰イオン性界面活性剤、T w e e n 2 0又はメガファック等のノニオン性界面活性剤、その他各種両性界面活性剤を使用することもできる。本発明では、ポリオキシエチレンオキチルフェニルエーテル（T r i t o n-X 1 0 0）等のノニオン性界面活性剤を使用することが好ましい。界面活性剤の溶液中の濃度は、通常0.05重量%～10重量% 特に好ましくは0.1重量%～5重量%である。

【0027】

タンパク質分解酵素としては、プロテアーゼKを使用することはできるが、他のプロテアーゼでも同様の効果を得ることができる。プロテアーゼは酵素であるため加温するのが好ましく、37℃～70℃で使用するものが好ましく、特に50℃～65℃で使用するものが好ましい。

【0028】

このように核酸が分散した水溶液中に、水溶性有機溶媒を添加して、表面に水酸基を有する有機高分子と接触させる。この操作により、試料溶液中の核酸が表面に水酸基を有する有機高分子に吸着される。本明細書中上記した操作で可溶化された核酸を、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着させるためには、可溶化した核酸混合液に水溶性有機溶媒を混合することと、得られた核酸混合液中に塩が存在することが必要である。

【0029】

即ち、核酸の周りに存在する水分子の水和構造を破壊することにより、核酸は不安定な状態で可溶化することになる。この状態の核酸を、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相と接触させると、核酸表面上の極性基と固相表面の極性基間で相互作用し、核酸は固相表面上に吸着するものと考えられる。本発明の方法では、可溶化した核酸混合液に水溶性有機溶媒を混合することと、得られた核酸混合液中に塩が存在することによって、核酸を不安定な状態にさせることができる。

(7)

【0030】

ここで用いる水溶性有機溶媒としては、エタノール、イソプロパノール又はプロパノールなどが挙げられ、中でもエタノールが好ましい。水溶性有機溶媒の濃度は、好ましくは5重量%～90重量%であり、さらに好ましくは20重量%～60重量%である。エタノールの添加濃度は、凝集物を生じない程度でできるだけ高くすることが特に好ましい。

【0031】

得られた核酸混合液中に存在する塩としては、各種カオトロピック物質（グアニジウム塩、ヨウ化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム）や塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、臭化ナトリウム、臭化カリウム、臭化カルシウム、臭化アンモニウム等が好ましい。特にグアニジウム塩は、細胞膜の溶解および核酸の可溶化の効果を併有するので特に好ましい。

【0032】

次いで、この核酸が吸着した表面に水酸基を有する有機高分子を本発明の洗浄液に接触させる。この洗浄液は、核酸と一緒に表面に水酸基を有する有機高分子に吸着した試料溶液中の不純物を洗い流す機能を有する。従って、表面に水酸基を有する有機高分子から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成を有する必要がある。洗浄液は、上記した通り、水溶性アルコール、及び必要に応じて界面活性剤を含む水溶液からなる。

【0033】

次に、表面に水酸基を有する有機高分子に吸着した核酸を脱着せしめうる溶液に、上記洗浄後の表面に水酸基を有する有機高分子を接触させる。この溶液には目的とする核酸が含まれているので、これを回収し、後に続く操作、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）による核酸の増幅に提供する。核酸を脱着せしめうる溶液としては、塩濃度が低いことが好ましく、特に好ましくは0.5M以下の塩濃度の溶液を使用する。この溶液としては、精製蒸留水、TEバッファ等が使用できる。

【0034】

(3) 核酸分離精製装置

本発明で用いる核酸分離精製装置は、少なくとも2個の開口を有する容器内に表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相を収容した核酸分離精製装置である。核酸分離精製装置の具体例を図1～6に示す。

【0035】

本発明の核酸の分離精製装置1は、図1に示すように円筒形のシリンジ3と、シリンジ3の内部に挿入されるピストン部材5と、シリンジ3の先端部に接続される固相保持部材7とを備えて成る。尚、本発明においては、シリンジ3内の液体が押し出される側を「先端」側とし、その反対方向を「基端」側とする。

【0036】

シリンジ3は、固相保持部材7が接続される先端部9を有し、該先端部9には第1開口部11が形成されている。またシリンジ3の基端側には指掛け部13が形成される基端部15を有し、基端部15には第2開口部17が形成されている。シリンジ3の内部には収納部19が形成されており、該収納部19には、第1開口部11または第2開口部17から入った液体を後述するピストン栓の密閉作用により保持可能である。

【0037】

図2に示すように、シリンジ3の先端部9には、固相保持部材7が外嵌め可能であるように外周面が先端方向へ縮径するテーパ21が形成されている。尚、このようなテーパ21の代わりに、図3に示すようにシリンジ3の先端部9の外周面に雄ねじ23を形成し、固相保持部材7の基端側内面に雌ねじ25を形成して、固相保持部材7がシリンジ3の先端部9に対して螺合式に着脱自在な構成とすることも可能である。

【0038】

またシリンジ3の先端部9の内側には、図5に最も良く示されているように、その任意の縦断面が、先端部9内の最も縮径された縮径部49から先端側へ向かって2次曲線的にカーブする形状を有する液体案内面27が形成されている。縮径部49により形成される円

(8)

形断面と、液体案内面とによって囲まれる領域は全体としてほぼすり鉢形状をしている。このような形状の液体案内面27の作用については後述する。またシリンジ3の先端部9の任意の縦断面では、先端部9の先端29が鋭角的に尖っており、後述する表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相の表面に圧接することで固相を保持する作用を発揮する。この点については後で詳述する。

【0039】

ピストン部材5は、第2開口部17側から収納部19内へ延びるプランジャ31と、プランジャ31の先端に接続され、収納部19の内面に密接可能なピストン栓33とを備えている。ピストン栓33はプランジャ31の先端に固定されており、従ってプランジャ31を押したり引いたりすることにより、ピストン栓33が収納部19内で往復動できるようにになっている。

【0040】

次に固相保持部材7は図4に示すように、ほぼ円筒形乃至若干の先細り形状をした本体部35を主体とし、その基端側が開放状態となっており、先端側は端板37によって塞がっている。端板37の中央からは先端側にノズル39が突出形成されており、ノズル39の内部には本体部35内へ通じる流通孔41が形成されている。端板37の基端側の内面には、シリンジ3の長手方向軸線にほぼ垂直な円形の固相支持面43が形成されており、該固相支持面43には、表面に水酸基を有する有機高分子から成る円形平板状の固相45が支持されている。この固相45は後で詳述するように試料溶液中の核酸を吸着及び脱着可能な材質で構成されている。

【0041】

また固相45の先端側には、クッション作用をなすポリプロピレン焼結フィルター46が設けられている。ポリプロピレン焼結フィルター46は、固相45同様、円形平板状の形態をしており、固相45と固相支持面43との間に設けられることにより、固相45がシリンジ3の先端部9によって押圧されるときに、固相45をその基端側から支持してクッション作用を提供する。これにより、固相45が過度に押し潰されて変形したり、固相45内に形成されている液体が流通する間隙が潰れて液体の流通性が悪くなることを防止することができる。

【0042】

固相保持部材7の本体部35の内側は、上記シリンジ3の先端部9に形成されたテーパ21に対応して先端方向へ縮径するようにテーパ47が形成されている。この固相保持部材7のテーパ47がシリンジ3の先端部9に形成されたテーパ21の外側に丁度嵌合することにより、シリンジ3と固相保持部材7との間を水密状態として一体化することができる。

【0043】

固相保持部材7がシリンジ3の先端部9に取り付けられているとき、前述したようにシリンジ先端部9の断面が鋭角的に形成された先端29が、固相45の円形外周縁のすぐ内側に圧接する。これによりポリプロピレン焼結フィルター46が多少押し潰された状態となるため、クッション作用を有するポリプロピレン焼結フィルター46の反作用により、固相45はシリンジ3の先端部9とポリプロピレン焼結フィルター46との間に挟持されるようになる。この結果、固相45はポリプロピレン焼結フィルター46を介して固相支持面43にしっかり支持されるようになる。上述したようにシリンジ先端部9の断面が鋭角的に形成された先端29が、固相45の円形外周縁のすぐ内側に圧接する構成を採用することにより、プランジャ31の操作によりピストン栓33が往復動するときに、収納部19内から外側へ押し出される液体または流通孔41を介して収納部19内へ流入する液体が、必ず固相支持面43内を通過するようになり、固相45の円形外周縁の外側を回って液体が流通することを防止できる。

【0044】

図6は、2次曲線的にカーブするような形状を有する液体案内面27が形成されているシリンジ3の先端部9において、収納部19内から外側へ押し出される液体が流れ出す様

(9)

子を示す説明図である。図6に示すように、先端部9内の最も縮径された縮径部49から2次曲線的にカーブするような形状を有する液体案内面27は、シリンジ3の長手軸線の先端側へ移行するに従って、単位長さ当たりの液体案内面27の断面の直径の拡張する率、即ち拡張率が小さくなっている。従って縮径部49近くでは急に拡張していくが、先端側へいくに従って拡張の度合いが徐々に緩やかになっていく。このような構成により、収納部19内から外側へ流れ出す液体の断面での流速分布は、縮径部49から固相45に至るまでの間でほぼ一定となり、従って固相45の全面に亘ってほぼ一定の流体圧が掛かるようになる。この結果、後述するシリンジ3の収納部19と外部との間での液体の流通時には、その核酸分離機能や洗浄機能等が固相45の全面に亘って有効に発揮されるため、効率的な核酸の分離精製を行うことができる。

【0045】

以上説明した核酸の分離精製装置では、固相保持部材7がシリンジ3と別部材となっており、固相保持部材7がシリンジ3から脱着自在となっているが、固相保持部材7をシリンジ3に対して脱着不可能な状態で固定してもよい、あるいは固相保持部材7とシリンジ3とを一体部材として最初から形成するようにしてもよい。

【0046】

（4）核酸分離精製装置の使用による核酸の分離精製方法

上記した核酸分離精製装置を使用した核酸の分離精製方法について説明する。まず、プランジャ31を先端側へ押し込んだ状態で、上記核酸分離精製装置1の流通孔41を核酸を含む試料溶液中に挿入する。次いでプランジャ31を基端側へ引いて収納部19内を減圧状態にして核酸を含む試料溶液を吸引し、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相45に接触させる。この操作により、試料溶液が固相45と接触して試料溶液中にある核酸が固相45に吸着する。

【0047】

適量の試料溶液を吸引後、プランジャ31を再び先端側へ押し込んで収納部19内を加圧して、吸引した液を排出する。この操作までに間隔を開ける必要はなく、吸引後直ちに排出してもよい。

【0048】

次に、プランジャ31の操作による上記と同様の収納部19内の減圧－加圧操作で本発明の洗浄液を収納部内に吸引し、これから排出して収納部内部を洗浄する。この溶液は収納部内に残留する試料溶液を洗い流すと共に、核酸と一緒に固相に吸着した試料溶液中の不純物も洗い流す機能を有する。

【0049】

次に、固相45に吸着した核酸を脱着せしめうる溶液を、プランジャ31の操作による上記と同様の収納部19内の減圧－加圧操作によって収納部19内に導入し、収納部19から排出する。この排出液には目的とする核酸が含まれているので、これを回収し、後に続く操作、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）による核酸の増幅に提供することができる。

【0050】

上記方法は、核酸を含む試料溶液及び洗浄液を流通孔41を介して収納部19内に吸引し、排出する方法であるが、プランジャ31を抜き取り、核酸分離精製装置の第2開口部17から収納部19内に核酸を含む試料溶液を注入し、プランジャ31を使用して流通孔41から試料溶液を排出するようにしてもよい。更に同様に核酸洗浄液及び固相45に吸着した核酸を脱着せしめうる溶液についても、第2開口部17から収納部19内に注入し、プランジャ31を使用して流通孔41から洗浄液を排出するようにしてもよい。

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0051】

【実施例】

（1）材料及び試薬

(10)

図1～図6に構造を示す核酸精製用カートリッジを使用し、第2開口部側より試料、洗浄液、蒸留水を順次注入し、そのたびにピストン部材（プランジャ）を挿入し、押した。また、核酸吸着固相としては、富士マイクロフィルターFR250（富士写真フイルム製）を使用した。比較用の核酸吸着固相としては、ガラスフィルターGF/D（ワットマン社製）（膜厚2mm）を使用した。核酸精製用吸着バッファー溶液及び洗浄液は以下の通り調製した。

【0052】

吸着バッファー

塩酸グアニジン（ライフテクノロジー製） 382g

Tris（ライフテクノロジー製） 12.1g

Triton-X100（ICN製） 10g

蒸留水 1000ml

【0053】

洗浄液

60%エタノール

【0054】

（2）核酸精製操作

λDNA（ライフテクノロジー社製）を100ng/mlの濃度に調整し、これをサンプルとして200μlに、吸着バッファー200μlとプロテアーゼK20μlを添加して、60℃で10分間インキュベートした。インキュベート後、エタノール200μlを加え、攪拌した。攪拌後、図1～図6に構造を示す核酸精製用カートリッジにこの液を注入した。注入後、ピストンにて液を押し出した。さらに、洗浄液500μlを注入し、ピストンにて液を押し出すことにより、カートリッジおよび吸着固相上の不純物を洗浄した。最後に、蒸留水200μlを注入し、ピストンにて液を押し出して、この液を回収した。

【0055】

（3）核酸の回収量の定量

（2）の操作により精製されたDNAの収量を以下の表1に示す。値は比較例及び本発明とも5回の繰り返しの平均値である。ODは5mmセルにて測定した。表1の結果より、比較例よりも本発明の場合の方がDNAの収量が高いことが分かる。

【0056】

【表1】

	230	260	280	260/280	DNA (μg)
比較例	0.115	0.405	0.234	1.73	8.1
本発明	0.344	0.945	0.492	1.92	19.9

【0057】

【発明の効果】

表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を含む核酸の分離精製方法において本発明の洗浄液を用いることにより、固相に吸着された核酸を脱着させることなく固相に非特異的に吸着された不純物だけを洗い流すことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の核酸分離精製装置を示す側断面図である。

【図2】本発明の核酸分離精製装置の分解斜視図である。

【図3】シリンジと固相保持部材の接合方法の他の実施の形態を示す側断面図である。

【図4】固相保持部材の拡大断面図である。

(11)

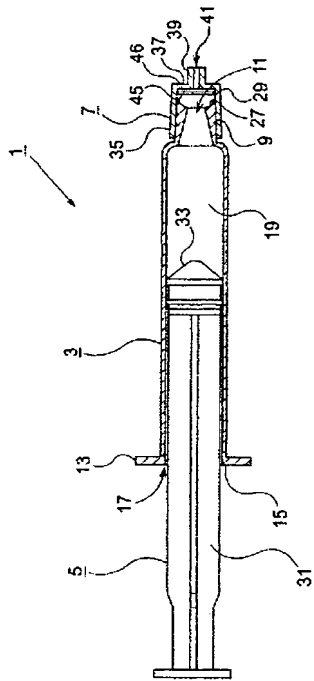
【図5】シリンジの先端部の縦断面図である。

【図6】シリンジの先端部内において、収納部内から外側へ押し出される液体が流れる様子を示す説明図である。

【符号の説明】

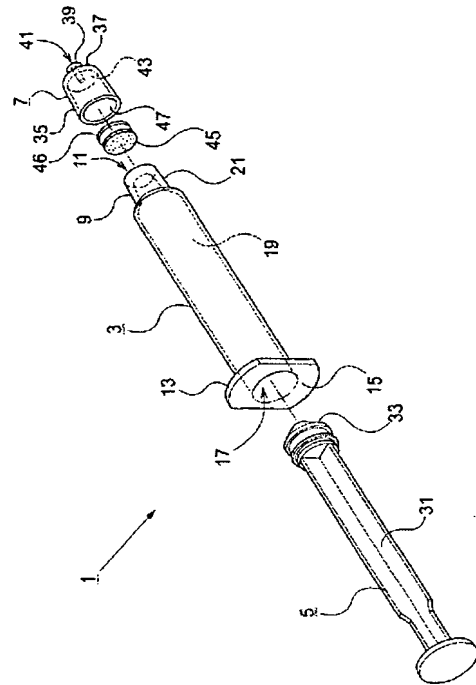
- 1 核酸の分離精製装置
- 3 シリンジ
- 5 ピストン部材
- 7 固相保持部材
- 9 シリンジの先端部
- 11 第1開口部
- 13 指掛け部
- 15 シリンジの基端部
- 17 第2開口部
- 19 収納部
- 21 テーパ
- 23 雄ねじ
- 25 雌ねじ
- 27 液体案内面
- 29 先端部の先端
- 31 プランジャ
- 33 ピストン栓
- 35 本体部
- 37 端板
- 39 ノズル
- 41 流通孔
- 43 固相支持面
- 45 固相
- 46 ポリプロピレン焼結フィルター
- 47 テーパ
- 49 縮径部

【図 1】

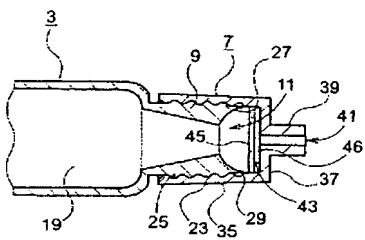


(12)

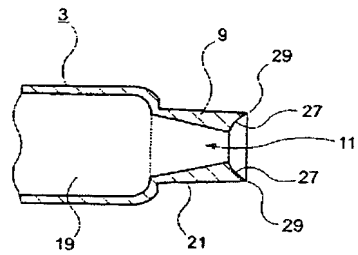
【図 2】



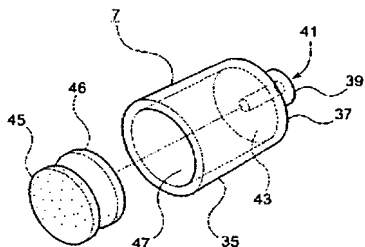
【図 3】



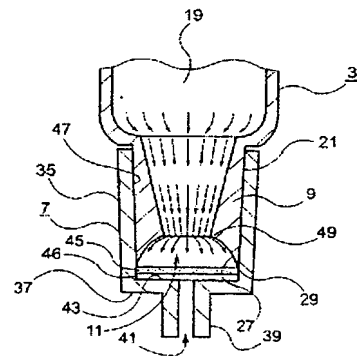
【図 5】



【図 4】



【図 6】



フロントページの続き

(72)発明者 森 寿弘

埼玉県朝霞市泉水 3-1-1-46 富士写真フイルム株式会社内

(72)発明者 牧野 快彦

埼玉県朝霞市泉水 3-1-1-46 富士写真フイルム株式会社内